

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einligungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) DD 287 951 A5

5(1) C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

Ir vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 332 720 7 (22) 15.09.88 (44) 14.03.91

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE
(72) Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE
(73) Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuerwerben, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE
(74) siehe (73)

(54) Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate

(55) Verfahren; Immobilisierung; Polyoxyalkylenglykole; mit Chlorameisensäureestern aktivierte Polymere; biologisch aktive Verbindungen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate, einschließlich ihrer thiolgruppenhaltigen Derivate, werden als ihre mit Chlorameisensäureestern aktivierten Ester mit biologisch aktiven Verbindungen umgesetzt, die nukleophile Gruppen besitzen. Die Reaktionen werden in wässrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen dieser Lösungsmittel miteinander und untereinander bei 0°C bis 150°C in Gegenwart von Puffersubstanzen oder säurebindenden Mitteln durchgeführt. Die erfindungsgemäßen Immobilisate besitzen ein breites Anwendungsspektrum in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß biologisch aktive Verbindungen mit durch Chloramellsäureester aktivierte Polyoxalkylenglykole oder deren ebenso aktivierten Monoalkoxyderivate sowie ihre thiolgruppenhaltigen Analoga in wäßrigen Lösungen oder organischen Lösungsmitteln oder Gemischen dieser miteinander und untereinander im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C, gegebenenfalls in Gegenwart von Puffersubstanzen oder säurebindenden Mitteln, umgesetzt werden und die mit Polyoxalkylenglykolen oder ihren Monoalkoxyderivaten modifizierten, biologisch aktiven Verbindungen aus den Reaktionslösungen nach an sich bekannten Verfahren isoliert und gereinigt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch aktive Verbindungen Biokatalysatoren wie Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme und Koenzyme oder biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine, zuckerbindende Proteine oder in vitro hergestellte Konjugate aus Biokatalysatoren und biokatalytisch inaktiven Proteinen oder nieder- und hochmolekulare Effektoren wie Nukleinsäuren, Bruchstücke von Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka, Sauerstoff bindende, aktivierende und transportierende, synthetische Verbindungen sowie Affinitätsliganden eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5 bis 12 bei 0°C bis 30°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden ausgeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C in Gegenwart säurebindender Mittel im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden erfolgen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung in wäßrigen Lösungen, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel in Gegenwart eines säurebindenden Mittels bei 0°C bis 100°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 8 Stunden erfolgen.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalosalze kondensierter Aromaten und Heteroaromatene eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Biokatalysatoren Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen an Polyoxalkylenglykole und ihren Monoalkoxyderivaten. Das Verfahren kann in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Biologisch aktive Verbindungen wie Biokatalysatoren, biokatalytisch inaktive Proteine oder Pharmaka, die kovalent an lösliche oder unlösliche Trägermaterialien gebunden wurden, werden bereits in großem Umfang praktisch genutzt. Stoffwandlerreaktionen durch biotechnologische Verfahren und auch Proteinreinigungsmethoden – auch solche im vergrößerten Maßstab – werden heute in vielen Fällen unter Einsatz unlöslich und damit wiederverwendbar gemachte, biologisch aktiver Verbindungen durchgeführt. Aber auch synthetische Makromoleküle wie Dextrans, Polyaminosäuren, Polyvinylalkohol oder Polyoxalkylenglykole, die in wäßrigen Systemen löslich sind, finden zunehmend Interesse und auch Anwendung in der Biotechnologie und Medizin. Koenzyme mit einem Adenintringsystem werden zum Beispiel an Typen der genannten, wasserlöslichen Polymeren kovalent gebunden und als solche Makromoleküle in biochemischen Reaktionen angewendet (BRD-Auslegeschrift 2841414). Aber auch Proteine – s. wohl biokatalytisch aktive als auch biokatalytisch inaktive – wurden schon an wasserlösliche Polymere gebunden (Trends Biotechnol., 1986, 4, 68–73), und die Immobilisate wurden auf ihre Anwendung hin geprüft.

Eine besondere Rolle bei der Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an wasserlösliche Polymere spielen Polyoxyalkylenglykole und ihr Monoalkoxyderivate. Dies ist darin begründet, daß diese Polymere sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Mit Vorteil können diese Polymeren damit auch in den genannten Lösungsmitteln modifiziert werden zu Polymeren mit anderen funktionellen Gruppen als den Hydroxylgruppen, die in den Grundpolymeren vorliegen. Von besonderer Bedeutung ist dabei aber auch, daß diese Polymeren zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen in organischen Lösungsmitteln unter wasserfreien Bedingungen aktiviert werden können und damit weitaus mehr Aktivierungsmethoden der Polymeren zur Verfügung stehen, als für Polymere, die in organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind, sondern nur in wässrigen Systemen. Für die Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate sind solche Aktivierungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln beschrieben, zum Beispiel mit Cyanurchlorid als Aktivierungsmittel. Diese Aktivierungsmethode für hydroxylgruppenhaltige Polymere ist aber auf Grund der hohen Toxizität des Cyanurchlids und seiner Substitutionsprodukte für Anwendungen von mit Cyanurchlorid aktivierten Polymeren in der Lebensmittelindustrie und auch Medizin als bedenklich einzuschätzen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein neues Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen an Polyoxyalkylenglykol und ihre Monoalkoxyderivate zu erarbeiten, daß nichttoxische, biozähnungsweise wenig toxische Aktivierungsmittel verwendet und stabile Immobilisate ergibt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen zu erarbeiten, bei denen diese an mit nichttoxischen oder weniger-toxischen Aktivierungsmitteln aktivierten, hydroxylgruppenhaltigen oder thiolgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykolen oder ihren ebenso substituierten Monoalkoxyderivaten kovalent gebunden werden. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch gelöst, daß die biologisch aktiven Verbindungen mit geeigneten, durch Chlorameisensäureester aktivierte Polymeren mit Hydroxylgruppen oder Thiolgruppen vom Typ der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, in wässrigen Lösungen oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen aus wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln im Zeitraum von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Reaktionstemperaturen von 0°C bis 150°C, gegebenenfalls in Gegenwart von Puffersubstanzen oder anderen säurebindenden Mitteln umgesetzt werden. Als aktivierte Polymere werden vorzugsweise mit Chlorameisensäure-N-hydroxysuccinimidester, Chlorameisensäure-1-hydroxybenzotriazolester oder N-(Chlorcarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktivierte, hydroxylgruppenhaltige oder thiolgruppenhaltige Polyoxyalkylenglykole oder mit den gleichen Aktivierungsgruppen substituierte Monoalkoxyderivate dieser Polymeren eingesetzt. Für die erfindungsgemäß Immobilisierungsreaktionen kommen aber auch andere Chlorameisensäureester in Frage, zum Beispiel mit Chlorameisensäure-p-nitrophenylester oder Chlorameisensäure-2,4,6-trichlorphenylester aktivierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre Monoalkoxyderivate und ihre thiolgruppenhaltigen Analoga, vor allem dann, wenn die Immobilisate außerhalb der Medizin und Nahrungsmittelindustrie verwendet werden sollen.

Als biologisch aktive Verbindungen können eine Vielzahl nieder- und hochmolekulare Verbindungen eingesetzt werden. Weitere Voraussetzung für das Gelingen der Immobilisierungsreaktionen, neben ihrer biologischen Aktivität, ist lediglich das Vorliegen funktioneller Gruppen mit nukleophilen Eigenschaften. Solche biologisch aktiven Verbindungen sind unter anderem Blokatalysatoren wie Enzyme, vorzugsweise aus den Klassen der Hydrolasen, Oxdoreduktasen, Transferasen und Isomerasen Mikroorganismen oder Zellen, beziehungsweise blokatalytisch inaktive Proteine wie Antikörper, Antigene, Hemoproteine, Albumine und andere oder niedermolekulare Verbindungen wie verschiedene Hormone, Vitamine, Koenzyme, Pharmaka, Synzyme und Affinitätsliganden, wie sie zum Beispiel in der Affinitätschromatographie benutzt werden. Da sich die mit Chlorameisensäureestern aktivierten Polymeren durch eine hohe Reaktivität auszeichnen, werden erfindungsgemäß auch instabile, biologisch aktive Verbindungen an diesen Polymeren immobilisiert, da die Anwendung auch milder Reaktionsbedingungen wie niedrige Reaktionstemperaturen oder kurze Reaktionszeiten zu Immobilisaten mit hoher biologischer Aktivität führt.

In Abhängigkeit von der Stabilität und Löslichkeit der biologisch aktiven Verbindungen – die aktivierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate sind sowohl in wässrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich – werden die Immobilisierungsreaktionen unter den verschiedenartigsten Reaktionsbedingungen ausgeführt. Eine Möglichkeit besteht darin, daß in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5 bis 12, vorzugsweise von 7 bis 9, bei 0°C bis 30°C gearbeitet wird und die Reaktionszeit in diesen Fällen 1 Stunde bis 12 Stunden beträgt. Weiterhin werden die Immobilisierungsreaktionen in wässrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C bei Reaktionszeiten von 1 Stunde bis 12 Stunden und in diesen Fällen vorwiegend in Gegenwart eines säurebindenden Mittels durchgeführt. Eine weitere erfindungsgemäß Immobilisierungsvariante ist dadurch gekennzeichnet, daß Blokatalysatoren und hierbei bevorzugt Enzyme, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel in Anwesenheit säurebindender Mittel bei 0°C bis 100°C im Verlauf von 1 Stunde bis 8 Stunden mit den aktivierte Polymeren umgesetzt werden.

Für die Bindung der bei den Immobilisierungsreaktionen freigesetzten Mineralsäure werden neben Puffersystemen auch andere säurebindenden Verbindungen verwendet. Dazu gehören zum Beispiel tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate der Alkalosalze kondensierter Aromaten der Heteroaromatnen.

Die Isolierung der an Polyoxyalkylenglycole und ihre Monoalkoxyderivate immobilisierten, biologisch aktiven Verbindungen ist nach verschiedenen Methoden möglich. Eine Möglichkeit besteht in der Dialyse, Ultrafiltration und Lyophilisierung der Reaktionslösungen. Eine andere Möglichkeit im Ausfällen mit organischen Lösungsmitteln der anorganischen Salzen, in zweidimensionalen nach Dialyse der Reaktionslösungen. Und schließlich können die Immobilisate, nachdem die Reaktionslösungen mit einer ausreichenden Menge Wasser versetzt wurden, zunächst mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln extrahiert werden und aus der organischen Phase durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel oder Einengen derselben und Versetzen der restlichen Lösungen mit Ether oder Petrolether durch Ausfällung isoliert werden. Bei besonderen Reinheitsanforderungen werden die Immobilisate mit Hilfe chromatographischer Methoden weiter gereinigt.

Nach dem erfundungsgemäßen Immobilisierungsverfahren werden eine Vielzahl stabiler und neuer Immobilisate von biologisch aktiven Verbindungen mit Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten synthetisiert. Auf Grund der großen Reaktivität der mit Chlorameisensäureestern aktivierten Polymeren sind die Umsetzungen unter milden Reaktionsbedingungen möglich, die zu Immobilisaten führen, die in der Medizin und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden können. Weitere Einsatzgebiete für die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslichen Polymeren sind die Biotechnologie, Chemie und Pharmazie.

Die Erfindung wird durch Beispiele weiter erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

10mg Penicillinacylase werden in 15ml eines 0,1 molaren Boratpuffers vom pH-Wert 8,0 gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,4g mit N-(Chlorkarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) in fester Form addiert bei einer Temperatur von 4°C. Die anfängliche Suspension und spätere Lösung wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 3 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Lösung wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, eine Ultrafiltration unterworfen, und die restliche Lösung wird lyophilisiert.

Ausbeute: 32mg

Beispiel 2

0,6g mit N-(Chlorkarbonyloxy)-succinimid aktiviertes w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 25ml trockenem Benzaldehyde gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,6g Imidazol und 20mg Lipase aus Rhizopus arrhizus addiert. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 60°C gerührt, danach filtriert und das Benzaldehyde im Vakuum bei Umgebungstemperatur abdestilliert. Der Rückstand wird in 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 aufgenommen, die Lösung wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, ultrafiltriert und der Rest der Lösung wird lyophilisiert. Der Rückstand wird gelochromatographisch mit Sphadex G25 weiter aufgereinigt, wobei eine biokatalytische Aktivität festgestellt wird.

Ausbeute: 43mg

Beispiel 3

1g mit N-(Chlorkarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Monomethoxy-polyethylenglykol (MG 5000) wird in 15ml destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. Zu dieser Lösung werden bei 4°C 50mg in 50ml 0,2 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 8,0 aufgelöstes Hämoglobin addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 3 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird die Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert, ultrafiltriert, und lyophilisiert. Eine weitere Reinigung des modifizierten Hämoglobins erfolgt durch Gelchromatographie an einer Säule, die mit Sephadex G25 gefüllt ist.

Ausbeute: 220mg

Beispiel 4

1g mit N-(Chlorkarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Monomethoxy-polyethylenglykol (MG 5000) wird in 15ml destilliertem Dimethylsulfoxid gelöst. Bei 4°C werden 50mg in 25ml 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 suspendierte Zellen vom Mikroorganismus Trichosporon cutaneum addiert. Die Suspension wird auf Zimmertemperatur erwärmt und 6 Stunden bei dieser Temperatur vorsichtig bewegt. Danach werden die modifizierten Zellen abfiltriert, mit obigem Phosphatpuffer gewaschen und bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert.

Beispiel 5

0,3g Eisen(III)-protoporphyrin IX und 0,8g Histamin werden in 15ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wird 1g mit 1-Chlorkarbonyloxy-4-nitrobenzen aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) in fester Form addiert. Die Lösung wird 3 Stunden bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen in 100ml destilliertes Wasser eingetragen. Nach dem Filtrieren wird die Lösung dreimal mit jeweils 20ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und auf etwa 10ml eingeengt. Dieser Rest wird mit 100ml Petrolether versetzt, und der ausgefallenen Niederschlag wird gesammelt und bei Umgebungstemperatur getrocknet.

Ausbeute: 520mg

Beispiel 6

Es werden 0,1g des Koenzyms NAD⁺ in 10ml destilliertem Wasser gelöst. Dazu werden 5ml Acet-nitril langsam zugetropft, in dem 500mg mit N-(Chlorkarbonyloxy)-5-norbornen-2,3-dikarboximid aktiviertes Polyethylenglykol (MG 6000) aufgelöst waren.

Unter pH-Kontrolle, der pH-Wert der Lösung sollte durch Zutropfen von geringen Mengen 0,01 n normaler Natronlauge im Bereich von pH-Wert 4 bis pH-Wert 5 gehalten werden, wird die Lösung 3 Stunden bei 20°C bis 30°C geröhrt. Die Lösung wird anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert und mit Natriumhydrogenkarbonat versetzt, so daß sie einen pH-Wert von 8,0 erreicht. Danach werden 2 g Natriumdithionit zur Lösung addiert und das modifizierte K₊ Enzym wird innerhalb 20 Minuten bei 50°C reduziert. Die Lösung wird erneut gegen destilliertes Wasser dialysiert, danach auf pH-Wert zwischen 10 und 11 gebracht und 60 Minuten auf 60°C bis 70°C erhitzt. Die Lösung wird abgekühlt, gegen eine 0,01 molar Kalliumchloridlösung von pH-Wert 8,0 dialysiert, ultrafiltriert und lyophilisiert.

Ausbeute: 185 g



1/3,AB,LS/2 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008726948

WPI Acc No: 1991-230963/ 199132

XRAM Acc No: C91-100482

Immobilising biologically active cpds. - by reacting with polyoxyalkylene activated as chloroformate ester giving prods of high stability
Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DEAK); ZENT MOLEKULAR AG (MOLE-N)

Inventor: KUHN M

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 287951	A	19910314	DD 332720	A	19890915	199132 B

Priority Applications (No Type Date): DD 332720 A 19890915

Abstract (Basic): DD 287951 A

Biologically active cpds. (I) are immobilised by reacting them with a chloroformate ester-activated polyoxyalkylene glycol (II), or its monoalkoxy deriv. or their analogues contg. thio gps. for 0.5-12 hr at 0-150 deg.C, then the immobilised product A) is recovered and purified conventionally. Reaction is in aq. soln., organic solvent or mixed aq./organic system, opt. in presence of buffer or acid acceptor.

Specifically (I) is e.g. a (synthetic)enzyme; microorganism, animal, plant or human cell; antigen, antibody, coagulation factor, enzyme conjugate, nucleic acid, pharmaceutical, etc.

(II) is activated by reacting in aq. and/or organic solvent (opt. in presence of buffer or acid binder) at 0-15 deg.C with e.g., N-hydroxysuccinimide or 1-hydroxybenzotriazole chloroformate esters or with N-(chlorocarbonyloxy) -5-norbornene-2,3 -dicarboximide (III).

USE/ADVANTAGE - (A) are useful in biotechnology, biochemistry, pharmaceuticals and medicine. They can be prep'd. without using highly toxic activitating agents (contrast use of cyanuric chloride); have high stability and biological activity, and because of the high reactivity of activated (II) can be prep'd. under mild conditions. (5pp Dwg.No.0/0)



1/3,AB,LS/1 (Item 1 from file: 345)
DIALOG(R)File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat
(c) 2002 EPO. All rts. reserv.

Acc no: 9707162

Basic Patent (No,Kind,Date): DD 287951 A5 910314

<No. of Patents: 001>

VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER VERBINDUNGEN AN
POLYOXYALKYLENGLYKOLE UND IHRE MONOALKOXYDERIVATE (German)

Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DE)

Author (Inventor): KUEHN MANFRED (DE)

IPC: *C12N-011/08;

CA Abstract No: 115(21)227838W

Derwent WPI Acc No: C 91-230963

Language of Document: German

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applie No	Kind	Date
DD 287951	A5	910314	DD 332720	A	890915 (BASIC)

GERMAN DEMOCRATIC REPUBLIC (DD)

Legal Status (No,Type,Date,Code,Text):

DD 287951	P	970605	DD ENJ	CEASED DUE TO NON-PAYMENT OF RENEWAL FEE (ERLOSCHEN DURCH NICHTZ. D. JAHRESGEB.)
-----------	---	--------	--------	--

Priority (No,Kind,Date): DD 332720 A 890915

No of Legal Status: 001

